

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ, ОНКОЛОГИИ
И РАДИОБИОЛОГИИ им.Р.Е. КАВЕЦКОГО

На правах рукописи

БУЛАВКА Анатолий Васильевич

ВЫЯВЛЕНИЕ ПОСТРАДАЦИОННЫХ РЕАКЦИЙ
КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР ПЕЧЕНИ И НЕЯРОПИЛЯ МОРСКИХ СВИНОК
МЕТОДОМ АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ

03.00.01-радиобиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

КИЕВ - 1992

Работа выполнена в Украинском научно-исследовательском институте нейрохирургии
и на кафедре биохимии биологического факультета Киевского университета им. Тараса Шевченко

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор А. Н. Васильев
доктор медицинских наук Г. Г. Скибо

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук Б. А. Цудзевич
кандидат биологических наук В. М. Андриянов

Ведущее учреждение:

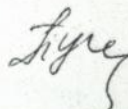
Днепропетровский университет.

Защита диссертации состоится 10 декабря 1992 года в 14 часов на заседании специализированного совета Д. 016. 38. 02 при Институте экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого АН Украины (252022, Киев-22, ул. Васильковская, 45).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.

Автореферат разослан 10 ноября 1992 года.

Ученый секретарь
специализированного совета
кандидат медицинских наук

 Г. Г. Пухова

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00816962 (W)

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы действия ионизирующей радиации в малых дозах на организм млекопитающих в настоящее время обостряется ситуацией, возникшей после катастрофы на ЧАЭС. Достаточно актуальной остается также проблема радиорезистентности и радиочувствительности органов и тканей.

Структурные изменения в тканях после действия ионизирующей радиации служат объективными критериями оценки тканевой чувствительности к лучевому фактору. Особую значимость при анализе биологического действия малых доз ионизирующей радиации приобретает выявление постлучевых структурных изменений, то есть той ситуации, когда может отсутствовать общепринятый радиобиологический критерий дозовой эффективности - детальный ответ объекта облучения.

Печень и мозг играют существенную функциональную роль в организме млекопитающих и являются относительно радиорезистентными органами (НКДАР ООН, 1982; P. Rubon et al., 1968; НКДАР ООН, 1985), обладающими низкой пролиферативной активностью клеток (Wheldon T. E. et al., 1982; Kraut J. E. et al., 1976; Носкалев Ю. И., 1991). Поэтому изучение их тканевой чувствительности очень важно. Целесообразно проанализировать черты подобия и характерные отличия в проявлении морфологически лучевых реакций нервной ткани и печени при сопоставлении результатов тотального действия рентгеновского излучения малой и детальной дозы.

Опубликованные в последние годы работы по исследованию особенностей клинического проявления поражений ЦНС у людей, облученных в различных дозах, недостаточно освещают структурные аспекты повреждений различных тканей (Reimer et al., 1986; Карповский А. Л., 1985; Calvo W. et al., 1984; Rubin P., Casaret G. W., 1986; Давыдов Б. И., Ушаков И. Е., Федоров В. П., 1991).

Цель и задачи исследования. Цель работы заключается в выявлении структурно-метаболических реакций в нервной ткани и печени морских свинок через одни сутки после общего рентгеновского облучения в дозах 2.58 МКл/кг и 180 МКл/кг.

Для достижения указанной цели в работе поставлены следующие задачи:

1. Изучить структурные и ультраструктурные изменения элементов нейропилы коры головного мозга и гепатоцитов после

АНБ им. В. Стефанки
АН УРСР

действия обшего рентгеновского облучения в дозах 2.58 мКл/кг и 180 мКл/кг и оценить эти изменения морфометрически.

2. Изучить и оценить ультрацитохимически активность Са⁺⁺-АТФазы в структурных элементах нейропиля головного мозга и в клетках печеночной ткани при действии обшего рентгеновского облучения в дозах 2.58 мКл/кг и 180 мКл/кг.

3. Провести анализ повреждающего действия обшего рентгеновского облучения в дозах 2.58 мКл/кг и 180 мКл/кг и дать сравнительную морфометрическую оценку выявленных поражений структурных элементов нервной и печеночной тканей.

Научная новизна. Впервые с применением количественного анализа светооптических, электронномикроскопических, электроцитохимических методов исследования установлены ранние морфологические и функциональные изменения в тканях печени и коры головного мозга в сравнительном аспекте у одних и тех же животных в ответ на обшее рентгеновское облучение в дозах 2.58 мКл/кг и 180 мКл/кг. Выявлено, что повреждения, наносимые радиацией на клеточном и субклеточном уровне в печени, независимо от дозы облучения, носят однотипный характер. Впервые с помощью метода анализа изображения и разработанных собственных алгоритмов и критериев дана количественная оценка структурных и цитохимических изменений в клетках. Впервые метод фрактального анализа изображений применен для оценки морфологических изменений в тканях облученных животных, что позволило количественно оценить изменения в изображении клеток и клеточных структур в случаях, когда дать количественную оценку, используя традиционные морфометрические критерии, практически невозможно.

Практическое значение. Полученные в работе данные углубляют современные представления о механизмах радиорезистентности и радиочувствительности клеток печени и коры головного мозга к повреждающему действию лучевого фактора. Проведенное изучение морфогенеза структурных изменений элементов печени и коры головного мозга открывает возможности нового подхода к вопросам разработки лечебных мероприятий и профилактики при радиационном поражении. Предложенные методы оценки изображений могут быть использованы при радиобиологических исследованиях на светооптическом и электронномикроскопическом уровнях.

Внедрение в практику. Ряд методических приемов, разра-

ВНИИОБЗ
1979

ботанных нами при выполнении настоящей работы, используется в лаборатории электронной микроскопии Киевского НИИ нейрохирургии, и в лаборатории нейроцитологии НИИ физиологии АН Украины. Критерии оценки изменений морфологии клеток и клеточных структур, программы и алгоритмы для их измерений применяются при проведении аналогичных исследований на светооптическом и электронномикроскопическом уровнях на других экспериментальных моделях.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на научно-практической конференции "Новые приложения морфометрии и математического моделирования в медико-биологических исследованиях" (Харьков, 1990), на 7 Всесоюзном совещании по проблемам автоматизации анализа изображений микроструктур, (Пушино, 1991), на научном семинаре 150 лет КМИ "Электронно-микроскопические исследования в экспериментальной фармакологии" (Киев, 1991), на научно-практической конференции "Структурно-функциональные единицы и их компоненты в органах висцеральных систем в норме и патологии" (Харьков, 1991), на 13 International Congress of Mathematical Biology (Paris, 1991), на 6 Asian Oceanian Congress of Radiology (Delhi, 1991), на научно-практической конференции "Применение электронной микроскопии в медицине" (Киев, 1992).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав, выводов и указателя литературы, содержащего 152 источника отечественных и зарубежных авторов. Работа изложена на 130 страницах. В работе приведены 44 фотографии микропрепаратов, 5 таблиц и 14 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Эксперименты проводились на морских беспородных свинках обоего пола, массой 250-300 гр., содержащихся в виварии в обычных условиях на стандартном рационе.

Животные подвергались однократному тотальному облучению рентгеновскими лучами на установке РУН-17, в двух дозах - 2,58 МКл/кг и 180 МКл/кг (Б. А. Пудзевич, 1984; А. Н. Васильев, 1986). Для микроскопических исследований отбирались образцы ткани печени и коры головного мозга через 1 сутки после радиационного воздействия. После гистологической обработки из парафиновых блоков изготавливали срезы, их окрашивали гематоксилином-эозином (О. В. Волкова, Ю. К. Елеський,

1984). При гистохимическом анализе экспериментального материала для выявления ДНК парафиновые срезы окрашивались по методу фельгена, для выявления РНК - по методу Браше, для выявления липофусцина - по методу Шморля (Х. Луппо, 1980). Просмотр и фотографирование препаратов проводили на микроскопе AXIOFOT фирмы ORTON (ФРГ).

Материал для электронной микроскопии готовили по общепринятой методике (Б. Уикли, 1979). После двойной фиксации, обезвоживания в спиртах, ацетоне или пропиленоксиде, тканевые блоки заливались в смесь эпоксидной смолой. Ультратонкие срезы готовились на ультрамикротоме УЛЬТРАКАТ-Е (фирмы РЯХЕРТ, ФРГ), контрастировались насыщенным спиртовым раствором уранилацетата и ацетатом свинца (Reynolds, 1963) и исследовались в электронном микроскопе EM-400T Филипс (Голландия).

Ультрацитохимическое определение локализации активности Ca^{++} -АТФаз осуществлялось по модифицированному методу Wachstein and Meysel (1987).

Морфометрические исследования проводились на компьютерном анализаторе изображения IBAS-2000, фирмы ORTON (ФРГ), с использованием программного обеспечения фирмы (Kontron Bildanalyse, 1986), а также программ и алгоритмов, разработанных самостоятельно (Булавка А. В., 1984, 1989, 1990). В отдельных случаях, когда возможности системы анализа были ограничены, изображение обрабатывалось на компьютере IBM PC по созданным программам (Булавка А. В., Головкин О. А., 1991), написанным на языке ПАСКАЛЬ.

Полученные цифровые данные были подвергнуты стандартной статистической обработке и корреляционному анализу (Г. Г. Автандилов, 1990; Н. А. Плохинский, 1978).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Проведенный светооптический анализ структуры коры головного мозга морских свинок показал, что при общем рентгеновском облучении в малых (2.58 мКл/кг) дозах изменение структуры отдельных нейроцитов проявлялось в их гиперхромности, увеличении диаметра ядра и уменьшении перинуклеарного пространства. Количество клеток с видимыми изменениями структуры было невелико и не превышало 4 - 6 % от общего количества выявляемых нейронов.

После действия общего облучения в дозе 180 мКл/кг изменения структуры нейронов более выражены и заключаются в по-

явлении значительного количества нейронов, измененных не только по гиперхромному, но и по гипохромному типу. Количество таких измененных клеток достигало 38 - 40 % общей популяции. В некоторых случаях из-за гибели нейронов обнаруживали даже очаги опустошений. Установлена характерная реакция глиальных элементов на экспериментальное воздействие - количество сателлитной глии увеличивалось возле нейронов. Отек нейрона прогрессировал - появлялись значительные очаги просветлений вокруг нейронов и капилляров.

Таким образом, на светоптическом уровне выявлен выраженный полиморфизм нервных и глиальных клеток после тотального лучевого воздействия. Вероятно, в коре головного мозга существует определенное количество нейронов высокочувствительных к действию изучаемого фактора (В. Земан, 1965; Л. А. Орбели, 1971). Изменения в пострadiационном периоде неуклонно нарастали, даже при малой дозе поражающего фактора носили деструктивно-отечный характер. Однако большинство нервных клеток оставалось неизменным даже при действии радиации в детальной дозе облучения.

При ультраструктурном исследовании клеток коры головного мозга морских свинок, подвергшихся внешнему облучению в дозе 2,58 мКл/кг, форма нейронов, как правило, не менялась, лишь в отдельных из них выявлялись изменения ядерно-цитоплазматических отношений. В них наблюдалось смещение ядра к периферии клетки. Матрикс цитоплазмы оставался светлым, органеллы имели обычную структуру. Сохраненная ядерная мембрана образовывала инвагинации различной величины. Состояние ядерного хроматина было обычным.

Однако среди значительного количества неповрежденных нейронов можно было видеть отдельные, небольшого размера нервные клетки, в цитоплазме которых наблюдалось множество митохондрий с разрушенными кристами, расширением перинуклеарного пространства в участках, ограниченных ядерными порами. В цитоплазме обнаружена дезориентация и расширение цистерн аппарата Гольджи, отслоение поверхностной мембраны нейрона по всему периметру и появление в цитоплазме клеток миелоидных телец. Анализ синаптических терминалей выявил лишь легкую степень "слипания" синаптических везикул. В постсинаптических участках, представленных в основном дендритами, в отдельных случаях можно видеть разрушение цитоп-

лазиатического матрикса. Статистический анализ морфометрических параметров нервных терминалей (ширина синаптической щели, ширина постсинаптического уплотнения, длина активной зоны и другие) интактных и облученных животных первой группы не установила достоверных различий между ними (табл. 1).

Существенные изменения наблюдались в клетках как астроцитарной, так и олигодендроцитарной глии - раздутые митохондрии с поврежденными или полностью разрушенными кристами, расширенные цистерны аппарата Гольджи с разрывами цитоплазматического матрикса.

Поражающее действие рентгеновского облучения в дозе 180 МКл/кг проявлялось в структурах нейропиля по-разному. Цитоплазма сомы отдельных "пораженных" нейронов содержала отчетливые митохондрии с деструкцией крист. Более устойчивыми к радиационному воздействию оказывались митохондрии малой величины. Везикулярная часть аппарата Гольджи и цистерны эндоплазматического ретикулума расширялись, в цитоплазме появлялись лизосомы и мультивезикулярные тельца. Наряду с вышеописанными измененными нейронами встречались нейроны, в цитоплазме которых повреждающее действие излучения проявлялось не столь очевидно: в их цитоплазме обнаруживалось лишь незначительное набухание митохондрий и частичное разрушение их крист.

В дендритах, кроме набухания и деструкции митохондрий, наблюдалось повреждение цитоскелетных структур, что проявлялось в хаотическом расположении цитоскелетных элементов, фрагментации микротрубочек и нейрофиламентов, вплоть до их полной деструкции. На поперечных срезах дендриты казались "пустыми", причем, это опустошение проявлялось на фоне нейропиля с большим количеством неповрежденных структур.

По коду большинства безмякотных аксонов в аксоплазме обнаруживались разрывы матрикса, которые формировали полости, ограниченные мембраной. В миелинизированных нервных волокнах при значительном разволокнении миелина мы оценивали количественно степень разволокнения миелина, вычисляя фрактальную размерность изображения миелиновой оболочки. В контроле она составляла 1.88, при облучении дозой 2.58 МКл/кг - 1.76, а при дозе 180 МКл/кг - 1.61. Наблюдалась вакуолизация аксоплазмы, дезориентация или исчезновение цитоскелетных элементов. Аксоплазма уменьшалась в объеме, резко нарушалась структура митохондрий. Повреждались в основном волокна

крупного калибра. В эндотелиальных клетках, выстилающих полость сосудов, характерны такие же изменения, как и в глиальных клетках - увеличение плотности цитоплазматического матрикса. Вблизи цитоплазматической мембраны наблюдались митохондрии с нарушенной структурой крист.

Наряду с вышеописанными изменениями отмечено увеличение числа первичных аутофаголизосом и полирибосом, несвязанных с цистернами эндоплазматического ретикулума. В области аппарата Гольджи оказались сохраненными только отдельные фрагменты диктиосом. В некоторых клетках наблюдалось полное или частичное разрушение поверхностной мембраны и, как следствие, выход содержимого цитоплазмы во внеклеточное пространство. Такое явление могло свидетельствовать о начинающейся гибели нейронов.

Наибольшие изменения были установлены в пресинаптических участках синаптических терминалей некоторых нейронов. Здесь имели место образование разрывов цитоплазматического матрикса, деградация синаптических везикул и цитоскелетных элементов, формирование миелиодных телец. В области синаптических соединений характерными были изменения двух типов. Изменения первого типа заключались в увеличении количества синаптических везикул, они заполняли всю терминаль, вытесняя митохондрии. Ширина пресинаптической плотности увеличивалась. Длина активных зон во многих синаптических терминалях значительно уменьшалась по сравнению с терминалями у интактных животных. В большинстве синаптических терминалей облученных животных были видны отчетливые изменения структуры постсинаптической плотности. Размеры этого участка синаптического соединения значительно увеличивались, повышалась их электроннооптическая плотность. В отдельных случаях можно было видеть дезинтеграцию поверхностной мембраны постсинаптических структур, вещество синаптической щели уплотнялось, в нем появлялись точечные компактные образования. Данные по увеличению размеров постсинаптической плотности, по необычайной чувствительности структур цитоскелета к повреждающему действию рентгеновского облучения могут свидетельствовать о том, что цитоскелетные белки являются теми молекулярными комплексами, которые наиболее чувствительны к используемому нами воздействию.

Изменения второго типа заключались в потемнении и смор-

шивании синаптических терминалей, их вакуолизации, иногда в расплавлении в них синаптических везикул и появлении ла-меллярных структур. Измененные пресинаптические терминали как бы поглощались отростками астроцитов.

Таблица 1.

Количественные характеристики нейропиля.

	через 1 сутки после облучения.		
	контроль	2.58МкЛ/кг	180МкЛ/кг
% измененных нейронов	1 ± 0.5	6 ± 1*	38 ± 4*
% измененных митохондрий	2 ± 1	6 ± 2*	16 ± 2*
заполнение митохондрий кристами (в % к площади митохондрий)	83 ± 4	37 ± 3*	16 ± 2*
% измененных синаптических терминалей	2 ± 1	7 ± 2*	15 ± 2*
ширина синаптической щели (нм.)	12.8 ± 0.9	14.2 ± 0.7	17.7 ± 0.6*
ширина постсинаптического уплотнения (нм.)	21 ± 1.2	28 ± 1.2*	42.9 ± 2.6*
отношение длины активной зоны к длине синаптического контакта	0.67 ± 0.05	0.71 ± 0.5	0.75 ± 0.5*
% измененных дендритов	1 ± 0.1	4 ± 1*	14 ± 2*
% площади дендрита, заполненной элементами цитоскелета	27 ± 3	9 ± 3*	5 ± 3*
% измененных аксонов	1 ± 0.5	3 ± 1	11 ± 2*
фрактальная размерность изображения	1.88 ± 0.03	1.76 ± 0.03*	1.61 ± 0.03*
ниелиновой оболочки (разволокнение)			

* - p < 0.05

В глиальных клетках наблюдалась вакуолизация цитоплазмы, деструкция митохондрий, расширение цистерн аппарата Гольджи. Подобная реакция была более выражена в астроцитах.

где хорошо выявлялось расширение перинуклеарного пространства, захват участков нервной клетки глиальной. После вышеуказанного облучения наблюдалось образование многочисленных впячиваний поверхностной мембраны, сопровождающееся ростом элементов эндоцитоза - окаймленных везикул. Это, надо полагать, свидетельствовало об активном процессе деградации поврежденной клеточной мембраны. Структура ядер не повреждалась, за исключением некоторого расширения ядерных пор.

Полученные нами результаты говорят о высокой чувствительности синаптического аппарата к радиационному воздействию и подтверждают данные о том, что наиболее реагирующими системами в ЦНС являются системы, обеспечивающие межнейрональную интеграцию (синапсы, гематоэнцефалический барьер) (В. В. Антипов, В. П. Федоров, Н. Б. Ушаков, 1989).

Результаты проведенного морфометрического анализа параметров синаптических контактов показали достоверное расширение синаптической щели (до 225 ± 19 мкм у животных с обшим облучением в дозе 180 МКл/кг, по сравнению с 128 ± 9 мкм у интактных животных), а также достоверное увеличение по сравнению с интактными животными ширины постсинаптической плотности соответственно с 210 ± 17 мкм до 429 ± 12 мкм в дозе 180 МКл/кг) (табл. 1).

Таким образом определено, что воздействие на животных обшего рентгеновского облучения в различных дозах уже через сутки приводит к нарушению отдельных ультраструктурных компонентов нервной ткани. Анализ полученных нами данных показал, что более постоянно поражаются органеллы синаптических терминалей, причем, по мере увеличения используемой дозы идет перераспределение соотношения повреждения различных синаптических соединений.

Представляется интересным факт об избирательной повреждаемости при действии ионизирующей радиации сомы нейронов и их отростков (табл. 1). Статистические данные показывают, что при используемых нами дозах поражается лишь небольшая доля нейронов, причем, такие поражения имеют тенденцию к очаговости. Так через 1 сутки после облучения в дозе 2.58 МКл/кг определялось 6% измененных нейронов, 7% синаптических терминалей, 3% аксонов с нарушенной миелиновой оболочкой, 4% дендритов с нарушением цитоскелета. При облучении в дозе 180 МКл/кг происходит увеличение числа поврежденных нейронов и

их отростков: нейронов - 38%, синаптических терминалей - 15%, аксонов - 11% и дендритов - 14% (табл. 1). Вполне возможно, что такая избирательность ответа на повреждающие факторы ионизирующего излучения каким-то образом коррелирует с функциональным состоянием нервных клеток и степенью их активности в момент воздействия.

Ультрацитохимическое изучение коры головного мозга животных, подвергшихся внешнему общему облучению, показывает угнетение активности Ca^{++} -АТФазы плазматических мембран. Установлено уменьшение количества продуктов ферментативной реакции (ПФР), уменьшалась электронная плотность ПФР, снижалась их дисперсность. Глыбки преципитата становились более мелкими, промежутки между ними увеличивались. В цистернах аппарата Гольджи активность фермента не определялась.

Таблица 2.
Активность Ca^{++} -АТФазы в нейропиле через 1 сутки после облучения.

	Контроль	2. 58мКл/кг	180мКл/кг
Синаптические терминали	100± 8	57± 7*	44± 7*
Миелиновые волокна	100± 10	71± 5*	58± 7*

* - $p < 0.05$

Полученные результаты указывают на резкое угнетение активности Ca^{++} -АТФазы в синаптической области и плазматической мембране миелинизированных нервных волокон, вплоть до полного отсутствия способности ткани к ферментативному гидролизу субстрата. Так в синаптических терминалях через 1 сутки при дозе 2. 58 мКл/кг активность Ca^{++} -АТФазы снижалась до 57% по сравнению с контролем и при дозе 180 мКл/кг - до 44%. В миелиновых волокнах при дозе 2. 58 мКл/кг - до 71% и при дозе 180 мКл/кг - до 58 % (табл. 2).

Обращает на себя внимание тот факт, что разрешающим фактором для этого нарушения является уже 2. 58 мКл/кг, а также то, что ультрацитохимическая организация ткани при дозе 180 мКл/кг принципиально не отличается от таковой при дозе внешнего облучения 2. 58 мКл/кг. Полученные результаты ультрацитохимического исследования активности Ca^{++} -АТФазы

согласуются с описанной ранее высокой чувствительностью к действию радиации метаболических систем обмена Са в нервной ткани (Васильев А. Н., 1986; Матышевская О. П., 1990). Таким образом, анализ ультрацитохимических изменений структурных компонентов нейропиля головного мозга экспериментальных животных, подвергшихся рентгеновскому облучению, свидетельствует о высокой чувствительности Са⁺⁺-АТФазы ЦНС к этому воздействию. А так как Са⁺⁺-АТФаза является мембранно-связанным ферментом, то высокая чувствительность ферментативного комплекса служит доказательством вовлечения в процесс развития постлучевого изменения клеточных мембран уже в самые ранние сроки после облучения. Снижение активности фермента в различных структурах клетки в сопоставлении с отсутствием ультраструктурных признаков повреждения клеток служит важным доводом в пользу представления о внутримолекулярных перестройках ферментативно-мембранных комплексов, индуцированных облучением. (Дворецкий А. И., 1991; Ely V. J., 1981)

Таблица 3.

Морфометрические характеристики ткани печени

	контроль	2. 5мКл/кг	180мКл/кг
кол-во клеток на поле	100 ± 15	38 ± 4*	38 ± 6*
площадь ядра	100 ± 3	97 ± 3	91 ± 3*
площадь клетки	100 ± 3	94 ± 3	84 ± 3
ядерно-цитоплазматическое соотношение	100 ± 5	94 ± 5	123 ± 9
периметр клетки	100 ± 4	110 ± 4	124 ± 5
квазифрактальная размерность клеточной мембраны	0. 88 ± 0. 04	0. 78 ± 0. 03	0. 67 ± 0. 04
кол-во митохондрий	100 ± 8	80 ± 6	62 ± 6*
диаметр митохондрий	100 ± 11	126 ± 9	144 ± 9*
кол-во дискомов	100 ± 8	82 ± 6	72 ± 5*
% измененных митохондрий	2 ± 1	7 ± 2*	16 ± 2*
заполнение митохондрий кристами (в % к площади митохондрий)	83 ± 4	37 ± 3	16 ± 2*

* - p < 0. 05

Весьма вероятно, что вовлеченные в вызванный облучением

патологический процесс структуры нейропиля теряют способность к тонкой регуляции протекающих в нем основных метаболических процессов.

Через 24 часа после однократного тотального облучения морских свинок в дозах 2,58 МКл/кг и 180 МКл/кг в клетках печени обнаружены изменения ряда внутриклеточных структур (табл. 3). Степень и глубина их выраженности неодинакова. В ходе морфометрического анализа ткани печени мы установили изменение размеров ядра и формы клеток как при большой, так и при малой дозовой нагрузке. Так, площадь ядра уменьшалась на 3% при облучении в малой дозе и на 9% при облучении в большой дозе, при этом площадь клетки уменьшалась на 6% и на 26% соответственно. Установлено, что периметр клетки печени увеличивался на 23%, что свидетельствовало об увеличении поверхности мембраны за счет изгибов и складчатости. Мы количественно оценивали складчатость мембраны как ее фрактальную размерность; в норме она составляла 0,88, при облучении в дозе 2,58 МКл/кг - 0,78, а при дозе 180 МКл/кг - 0,67. Ядерно-цитоплазматические соотношения оставались неизменными через сутки после облучения в малой дозе и увеличивались на 15% при облучении в большой дозе. Подсчет количества клеток в поле зрения показал уменьшение их количества за счет расширения синусоидов и отека стромы (табл. 3).

При гистохимическом анализе реакции клеток печени на малые дозы было установлено, что содержание РНК возрастало на 77% на 3 сутки после воздействия радиации. Эта величина достигала максимального значения - 247% к 7 суткам. Большая дозовая нагрузка отодвигает сроки максимального увеличения (до 217%) содержания РНК к 14 суткам. Изучение количественного содержания ДНК показало, что под влиянием облучения как малой, так и большой дозой содержание ДНК в печени на первые сутки снижалось в 2-3 раза, а затем постепенно увеличивалось и достигало исходного уровня к 14 суткам после воздействия (табл. 4).

Содержание липофусцина в гепатоцитах постепенно снижалось до 41% к 5 суткам после облучения малой дозой, а при облучении животных большой дозой на 7 сутки снижалось до 42%. Эти данные приведены в таблице 4.

Проводился подсчет количества клеток в поле зрения через 1, 3, 5, 7, 14 суток после облучения. Отмечено снижение количества клеток до 36%, по сравнению с контрольными величинами.

ни, за первые сутки после облучения, которое не восстанавливалось к 14 суткам (табл. 4).

Таблица 4.

Гистохимические характеристики ткани печени.

		К	1с	3с	5с	7с	14с
ДНК	ИД	100±7	59±3*	72±8*	80±4*	88±5	91±6
	БД	100±7	40±3*	58±5*	76±5*	71±4*	100±4
РНК	ИД	100±8	90±3	177±13*	187±6*	247±10*	232±15*
	БД	100±8	105±5	104±11	189±10*	198±15*	217±8*
ЛИПОФУСЦИН	ИД	100±11	94±5	59±4*	41±2*	53±2*	60±2*
	БД	100±11	138±5*	100±6	65±5*	42±4*	57±4*
КОЛ. КЛЕТОК НА ПОЛЕ	ИД	100±15	38±4*	28±3*	33±3*	52±2*	41±2*
	БД	100±15	38±6*	39±3*	45±2*	42±3*	48±1*

* - $p < 0,05$

малая доза 2,58 мКл/кг-ИД большая доза 180 мКл/кг-БД

Электронномикроскопическое исследование ткани печени морской свинки через 24 часа после облучения в дозе 2,58 мКл/кг показало, что альтерирующее воздействие радиации отразилось как на структурной организации гепатоцитов, так и на структурах геномикрощиркуляторного русла печени.

В цитоплазме гепатоцитов отмечается уменьшение количества клеточных органелл и вытеснение оставшихся структур на периферию клетки продуктами катаболизма гликогена и фрагментированными остатками канальцев агранулярной эндоплазматической сети. В отдельных гепатоцитах депонирование гликогена и жировых включений было настолько велико, что они полностью оттесняли единичные канальцы эндоплазматической сети и митохондрии. По всей цитоплазме гепатоцитов, а также в пространстве Лиссе и желчных капиллярах, обнаруживались миелиновые фигуры. Ядра гепатоцитов имели обычное для этих клеток строение. Гетерохроматин был сконцентрирован, в основном, по периферии ядра и в зоне относительно крупных ядершек. Как правило, обнаруживались двуядрышковые ядра.

Синусоиды печени были, в основном, спавшиеся, а висти-

лакие их эндотелиальные клетки значительно истончены, в некоторых участках полностью отсутствовали. Некоторые же синусоиды, наоборот, расширены. Просветы синусоидов могли быть выполнены электронноплотным содержимым, клеточным детритом и форменными элементами крови. В пространстве Диссе обнаруживалось большое количество фрагментированных и свободно расположенных микроворсинок гепатоцитов. Следовательно, радиационное воздействие на морских свинок в дозе 2.58 мКл/кг приводит к существенным изменениям в структурных компонентах клеток печени. Большая часть повреждений не являлась специфичной для радиационного воздействия, вместе с тем, изменения в структурной организации мембран, образование миелиновых фигур, связанных, очевидно, с усилением перекисного окисления липидов, можно считать характерными для радиационного повреждения.

При облучении в дозе 180 мКл/кг на некоторых срезах обнаруживалось полное нарушение связи между клетками. Так же как и при воздействии в дозе 2.58 мКл/кг, в гепатоцитах отмечалось вытеснение внутриклеточных компонентов продуктами перерождения гликогена в жиры с последующим их разрушением. Липидные включения имели вид глобулярных телец низкой электронной плотности, в части гепатоцитов они формировали липидные включения, содержащие миелиновые фигуры. Значительно уменьшалось количество митохондрий, при этом матрикс их был резко гиперосмирован. В некоторых клетках обнаруживались гипертрофированные митохондрии, содержащие миелиновые включения. Комплекс Гольджи полностью деформирован. Ядра гепатоцитов были небольших размеров, пикнотичны.

При облучении животных рентгеновскими лучами в дозе 180 мКл/кг в печени отмечены два вида синусоидов - спавшиеся синусоиды и предельно расширенные. В обоих случаях эндотелиальная выстилка была значительно истончена, вплоть до размеров толщины двух плазматических мембран; иногда она образовывала фенестры, что не было характерно для эндотелия синусоидов печени. В эндотелиоцитах обнаруживалось усиленное вакуолеобразование с последующим отторжением участков цитоплазмы с вакуолями в просвет капилляров или же в периваскулярное пространство Диссе, где скапливались десквамированные микроворсинки гепатоцитов. Эти изменения, по всей видимости, резко затрудняли обменные процессы в клетках печени.

Таким образом, вне зависимости от величины дозы радиа-

ционного облучения наблюдались изменения структурной организации гепатоцитов и микроциркуляторного русла печени морской свинки, что, вероятно, затрудняло возможность нормального ее функционирования. вплоть до полного угнетения функции на терминальных стадиях цитопатологического процесса при высокой дозе радиационного облучения.

Электронногистохимический анализ исследуемой ткани обнаружил изменение характера отложения ПФР при экспериментальном воздействии облучением в дозе 2.58 мКл/кг. Данные изменения затрагивали прежде всего распределение ПФР на плазматических мембранах и проявлялись в уменьшении количества продуктов реакции. Фосфат свинца мог определяться в интерстициальном пространстве вне связи с мембранами. Кроме того, были выявлены участки клеточной мембраны с избыточным накоплением ПФР. Фосфат свинца локализовался также в цитоплазме гепатоцитов. Упорядоченное отложение ПФР сменялось хаотичным его распределением в эндотелии капилляров. Локусы отложения фосфата свинца определены в конденсированном хроматине ядер гепатоцитов.

Таблица 5.

Активность Ca^{++} -АТФазы в ткани печени через 1 сутки после облучения.

	КОНТРОЛЬ	2.58мКл/кг	180 мКл/кг
мембраны гепатоцитов	100 ± 7	79 ± 5*	66 ± 4*
микроворсинки	100 ± 7	60 ± 4*	56 ± 6*
ядрышки гепатоцитов	100 ± 8	52 ± 5*	47 ± 5*

* - $p > 0.05$

Через 1 сутки после облучения животных рентгеновскими лучами в дозе 180 мКл/кг ультрагистохимическая картина принципиально не отличается от таковой через сутки после облучения в дозе 2.58 мКл/кг. Характерно дальнейшее уменьшение накопления ПФР. Активность фермента была в меньшей степени угнетена в микроворсинках и в плазматической мембране гепатоцитов со стороны синусоидальной поверхности (табл. 5).

Проводя сравнительный анализ влияния облучения рентге-

новского облучения на структуру и ультраструктуру ткани печени и нейропиле морских свинок, можно отметить множественность проявлений поражения в этих тканях. В нервной ткани страдает сома нейронов и их отростки, а также глиальное окружение. В ткани печени проявляются постлучевые изменения структурной организации как гепатоцитов, так и гемомикроциркулярного русла и синусоидов. Как в ткани печени, так и в нейропиле под влиянием общего рентгеновского облучения установлены поражения митохондрий, аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикулума, установлено изменение ядерноцитоплазматического соотношения, повреждения мембранных структур. Обращают на себя внимание глубокие структурные изменения клеток, обуславливающих функциональную специфичность ткани, а также элементов, ответственных за интеграцию клеток в ткань. В нейропиле нарушались структуры, отвечающие за межнейронную связь: в дендритах происходило нарушение цитоскелета, менялась структура миелиновой оболочки аксонов, в синаптических терминалях происходила дегградация синаптических везикул, увеличивались ширина синаптической щели и постсинаптическое уплотнение. В гепатоцитах наблюдалось уменьшение количества клеточных структур, образование миелидных фигур и появление липидных включений. Отчетливо проявлялись нарушения структуры синусоидов.

Постлучевые изменения в митохондриях нейронов и гепатоцитов имели несколько различный вид. Если в нейропиле после лучевого воздействия выявлялись раздутые митохондрии с разрушенными кристами, то в клетках печени после действия радиации обнаруживались митохондрии с гипероснированным матриксом, содержащие мелкие, хлорьевидные включения и миелиновые фигуры, встречались повреждения их наружной мембраны. Количество измененных митохондрий и в нейропиле, и в ткани печени почти не отличалось: в нейропиле при облучении малой дозой 6%, а при большой 16% от общего количества, в ткани печени 7% и 18% соответственно. На наш взгляд этот факт заслуживает внимания, поскольку нервная ткань и печень рассматриваются некоторыми авторами как ткани с разной радиочувствительностью (P. Rubin, G. W. Casarett, 1966).

Действие общего рентгеновского облучения вызывало повреждение структуры аппарата Гольджи и эндоплазматической сети и нейрона, и гепатоцита. В отдельных нейронах при облуче-

нии в дозе 2.58 мКл/кг вакуоли аппарата Гольджи и цистерны эндоплазматического ретикулаума расширялись, в цитоплазме появлялись лизосомы и мультивезикулярные тельца. После действия радиации в дозе 180 мКл/кг нами установлено увеличение числа первичных аутофаголизосом и полирибосом, несвязанных с цистернами эндоплазматического ретикулаума. В этих же условиях в области аппарата Гольджи оставались только отдельные фрагменты диктиосом. В гепатоцитах уже при облучении в дозе 2.58 мКл/кг происходила фрагментация канальцев эндоплазматической сети. Канальцы лишены рибосом, в цитоплазме свободные рибосомы встречались крайне редко. При облучении в дозе 180 мКл/кг в зоне расположения митохондрий сохранялись обрывки канальцев агранулярной эндоплазматической сети, комплекс Гольджи был полностью деформирован.

Ультрацитохимическое исследование нейропиля и печени животных, подвергшихся внешнему рентгеновскому облучению, показало угнетение активности Ca^{++} -АТФазы плазматических мембран через сутки после лучевого воздействия. Степень изменения активности Ca^{++} -АТФазы в нейропиле и ткани печени совпадала. При дозе 2.58 мКл/кг активность Ca^{++} -АТФазы снижалась в различных структурах нейропиля до 57-71% по сравнению с контролем. При той же дозе облучения активность фермента в различных структурах печени снижалась до 52-79%. Общее рентгеновское облучение в дозе 180 мКл/кг снижает активность Ca^{++} -АТФазы в нервной ткани до 44-56%, а в печени - до 47-66%. Таким образом, гистохимический анализ ультрацитохимических изменений структурных компонентов головного мозга и печени животных, подвергшихся тотальному рентгеновскому облучению, указывает на высокую чувствительность Ca^{++} -АТФазы к действию лучевого фактора. Так как Ca^{++} -АТФаза является мембранно-связанным ферментом, то высокая чувствительность ферментативного комплекса служит доказательством вовлечения в процесс клеточных мембран уже в самые ранние сроки после используемого воздействия.

В коре головного мозга и печени облученных животных происходило нарушение межклеточных коммуникаций уже через сутки после облучения, что, вероятно, снижало возможность нормального функционирования органа. В нейропиле, по нашему мнению, наиболее существенным являлось нарушение синаптического аппарата и проводящих отростков нейрона - аксонов и

АНС им. В. В. Стефанова
АН УРСР

дендритов. В печени мы нашли образование широких просветов в зоне межклеточных соединений на фоне сохранения точечных контактов в зоне десмосом, уменьшалась общая длина шелевых зон соприкосновения клеток.

Еще одной характерной чертой подобия постлучевых эффектов в нервной ткани и печени, по нашему мнению, является очаговая локализация изменений в структуре нейропиля и печени после облучения в дозе 2.58 мкЛ/кг. При облучении в дозе 180 мкЛ/кг в нейропиле поражения сохраняют очаговый характер, а в печени принимают диффузный характер.

Проводя сравнительный анализ действия общего рентгеновского облучения в дозе 2.58 мкЛ/кг и 180 мкЛ/кг, мы рассматривали измеренные параметры как точки в многомерном пространстве, число измерений которого равно числу измеренных параметров. Метрика позволяет определить расстояние между точками, то есть построить отображение из данного пространства параметров в множество действительных чисел. Для нервной ткани расстояние между контролем и состоянием после облучения в дозе 180 мкЛ/кг в 3 раза больше, чем расстояние между контролем и состоянием после облучения в дозе 2.58 мкЛ/кг. В печени это расстояние отличается только в 1.7 раза. То есть увеличение дозы в пределах от 2.58 мкЛ/кг до 180 мкЛ/кг увеличивает постлучевые структурные изменения в нервной ткани в 3 раза, а в печени только в 1.7 раза по измеренным нами параметрам. Из наличного множества оцененных нами параметров выбираем минимальное подмножество параметров, присутствующих как в ткани печени, так и в нервной ткани. Сравнивая теперь изменения в нейропиле и ткани печени облученных животных, мы обнаружили, что изменения в печени в 1.5 раза больше, чем в нейропиле, при облучении в дозе 2.58 мкЛ/кг, и в 2 раза - при облучении в дозе 180 мкЛ/кг.

Сравнивая влияние общего рентгеновского облучения в дозе 2.58 мкЛ/кг и 180 мкЛ/кг на ультраструктурную и ультрацитохимическую картину нейропиля можно отметить общую направленность изменений. Очаговый характер распространения поражения сохраняется и при увеличении дозы, ультрацитохимическая организация ткани принципиально не отличается. При облучении в дозе 180 мкЛ/кг, по сравнению с 2.58 мкЛ/кг, увеличивается количество пораженных структур и степень их поражения.

В ткани печени ультрацитохимическая картина при двух разных дозах принципиально не отличается, нет и статистически достоверной разницы между количественными оценками угнетения активности Ca^{++} -АТФазы при этих дозах. Большая часть повреждений в ткани печени при облучении в дозе 2,58 мКл/кг не являлась специфичной для рентгеновского воздействия, однако изменения в структурной организации мембран, образование миелиновых фигур можно считать характерными для рентгеновского повреждения. При облучении в дозе 180 мКл/кг установлено увеличение изменений, наблюдаемых при облучении в дозе 2,58 мКл/кг.

ВЫВОДЫ.

1. Через 1 сутки после тотального рентгеновского облучения морских свинок в дозах 2,58 мКл/кг и 180 мКл/кг в клетках коры головного мозга и печени наблюдается сложный комплекс морфоцитохимических изменений, проявляющихся на нескольких уровнях структурной организации тканей.

2. Морфоцитохимические изменения в нейропиле коры головного мозга морских свинок через 1 сутки после тотального облучения в дозах 2,58 мКл/кг и 180 мКл/кг носят очаговый характер.

3. Морфоцитохимические изменения в печени через 1 сутки после тотального рентгеновского облучения в дозе 2,58 мКл/кг носят очаговый, а в дозе 180 мКл/кг - диффузный характер.

4. Для радиационного поражения нейропиля характерны: а) высокая чувствительность структур синаптических соединений, обеспечивающих межнейрональные связи и интеграционные свойства нервной ткани; б) избирательное поражение элементов матрикса отдельных нервных клеток коры головного мозга, включая их сому, аксоны, дендриты, что может свидетельствовать о высокой чувствительности к лучевому фактору со стороны функционально однотипных нейронов.

5. Для радиационного поражения печени характерна высокая чувствительность к лучевому фактору внутриклеточных мембран гепатоцитов и эндотелия синусоидов.

6. Через 1 сутки после облучения в клетках печени существенно меняется количественное содержание ДНК, РНК и липофусцина. Изменения в печени при облучении в дозе 2,58 мКл/кг и 180 мКл/кг однонаправлены.

7. Ультрацитохимический количественный анализ изменений

169209

локализации активности Ca^{++} -АТФазы в нейропиле и печени поддерживает сложный и многокомпонентный процесс, связанный с общим угнетением активности регуляторной транспортной системы. Наибольшая выраженность патологического процесса проявлялась в мембранных образованиях.

СПИСОК РАБОТ. ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Количественная оценка электронно-гистохимических реакций системой анализа изображения IBAS-2000 //Тез. докл. конф. "Новые приложения морфометрии и математического моделирования в медико-биологических исследованиях". -Харьков, 1990. -С. 165/ Соавт. :Тушевский В. Ф.
2. Анализ количественного содержания нуклеиновых кислот в клетках паренхиматозных органов морских свинок, подвергнутых рентгеновскому облучению //Тез. докл. Всесоюз. совещание по проблемам автоматизации анализа изображений микроструктур. -Пушино, 1991. -С. 12.
3. Содержание липофусцина и структурные перестройки в гепатоцитах морских свинок при общем рентгеновском облучении //Тез. докл. конф. "Структурно-функциональные единицы и их компоненты в органах висцеральных систем в норме и в патологии". -Харьков, 1991. -С. 204. /Соавт. :Васильева Н. , Постернак Н. Н.
4. Гистохимический анализ реакций лимфоидных органов и печени морских свинок в динамике лучевого поражения //Врачебное дело. -1992. -Н 6. -С. /Соавт. Васильев А. Н. , Постернак Н. Н.
5. Морфометрический анализ клеточных реакций внутренних органов морских свинок в динамике лучевого поражения //Врачебное дело. -1992. -Н 7. -С. /Соавт. Постернак Н. Н. , Васильева Н. Н.
6. Изучение активности Ca^{++} -АТФазы синаптической области коры головного мозга в динамике радиационного воздействия // Тез. докл. конф. "Применение электронной микроскопии в медицине". -Киев, 1992. -С. 65/ Соавт. Скибо Г. Г. , Зинчук В. С.
7. The categorical Approach to the formalisation of the concept of fractality in Biology // "13 International of Mathematical Biology. "-Paris, -1991. /Golovko O. Y.
8. Morphogenetic Response of the cell lymphoid organs after the whole X-Ray Radiation // "6 ASIAN Oceanian Congress of Radiology". -New Delhi, -1991. /Vasiliev A. N. , Posternak N. N.
9. Enzyme Ultracytochemical Demonstration of Ca -ATPase in the Rat Cerebral Cortex //FOLIA HISTOCHEMICA ET CYTOBIOLOGICA vol. 30. -N 1. -C13-16/V. S. ZINCHUK, V. F. TUSHEVSKY.

Подп. в печ. 05.II.92. Формат 60x84/16. Бумага тип. Офс. печать.
Усл. печ. л. 1,16. Усл. кр.-отт. 1,16. Уч.-изд. л. 1,0. Тираж
100 экз. Зак. 310. Бесплатно.

Отпечатано в Институте математики АН Украины
252601 Киев 4, ГСП, ул. Терещенковская, 3

469209

AB 26.290

AB 26.290